

تأثیر نوسانات شوری بر میزان رشد، زیتوده و رنگدانه کلروفیل a و کارتنوئید

ریز جلبک *Nannochloropsis oculata*مریم رحیمی سورویی^{۱*}، کیومرث روحانی قادیکالایی^۲، فلورا محمدی زاده^۱

* m.rahimisuruee@gmail.com

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، بندرعباس، ایران. صندوق پستی: ۷۹۱۵۹-۱۳۱۱

۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران، صندوق پستی: ۱۵۹۷

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۴

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

لغات کلیدی: شوری، کلروفیل a، کارتنوئید، رشد، *Nannochloropsis oculata*

چرمهینی ۱۳۹۰). یکی از جذاب‌ترین ویژگی‌های موجودات آبی رنگ آنها می‌باشد که منبع رنگی آنها از مواد غذایی موجود در محیط زیست آنها می‌باشد (Kop & Durmaz, 2008). ریزجلبک‌ها حاوی رنگدانه‌های زیادی مثل کلروفیل (از ۵/۰ تا ۱ درصد وزن خشک آنها) و کارتنوئیدها (به طور متوسط ۰/۱ وزن خشک آنها) می‌باشند (Rebollosa Fuentes et al., 2000).

کارتنوئیدها رنگدانه‌های محلول در چربی هستند که بطور عمده در گیاهان، جلبک‌ها و باکتری‌های فتوسنتزکننده یافت می‌شوند (Guedes et al., 2011). همانطوریکه انتظار می‌رود جانوران قادر به سنتز کارتنوئیدها نیستند، و آنرا از طریق رژیم غذایی خود دریافت می‌کنند (Gourveia, 2003). کارتنوئیدها مسئول رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز دربرگ‌ها، میوه‌ها، گل‌ها و رنگ پره‌های بسیاری از پرندگان، حشرات، ماهی قزل‌آلا و سخت پوستانی نظیر خرچنگ و میگو می‌باشند. کارتنوئیدها به عنوان پیش ساز ویتامین A عمل کرده و از کمبود آن جلوگیری می‌نماید (Pisal & Lele, 2005). کارتنوئید یکی از رنگدانه‌های طبیعی با خاصیت آنتی-

ریزجلبک‌ها در ابتدای زنجیره غذایی آبزیان دریایی قرار دارند و از ضروریات غذایی سالن‌های تکثیر آبزیان مختلف دریایی از جمله دو کفه‌ای‌ها، نرم‌تنان، مراحل لاروی سخت پوستان و مراحل اولیه رشد برخی ماهی‌ها هستند. ریزجلبک‌ها همچنین برای تولید ژئوپلانکتون‌ها (کوپه - پودا، روتیفر، آرتیمیا) ضروری هستند (Gent, 2001). یکی از مشهورترین گونه‌های جلبک مورد استفاده در آبی‌پروری عبارت است از *Nannochloropsis oculata* که رایج‌ترین ریزجلبک مورد استفاده برای تولید ژئوپلانکتون‌ها (روتیفر) می‌باشد (Heasman et al., 2000). یکی از مهمترین عوامل برای کشت ریزجلبک شوری است که برای به دست آوردن بیشترین مقدار تولید، بهتر است ریزجلبک در دامنه شوری به نسبت کم پرورش داده شوند. یکی از کاربردهای اصلی ریزجلبک‌ها در زمینه آبی‌پروری، مربوط است به تهیه مواد مغذی یا مکمل‌ها و مصرف تازه به تازه آنها (به عنوان صرفاً مکمل یا ماده افزودنی به تغذیه اصلی) و یا برای رنگدار کردن گوشت ماهی آزاد و تحریک دیگر فعالیت‌های موجودات است (آذری تاکامی و

انجام گرفت. به منظور مطالعه اثر شوری‌های مختلف، ریزجلبک *N. oculata* در ارلن‌های ۳ لیتری محتوی ۲/۵ لیتر آب دریای استریل شده محتوی محیط کشت $f/2$ و تحت شرایط یکسان با درجه حرارت 25°C - 22°C ، و تحت شوری‌های مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۲، ۳۵، ۵۰ ppt)، قلیائیت ۸ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی (شدت نور ۵۰۰۰ لوکس)، ۱۲ ساعت تاریکی (و به مدت ۱۴ روز در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد (Guillard & Ryther, 1962). شوری‌های بالای ۳۵ppt با افزودن نمک دریا و شوری‌های پائین ۳۵ppt با افزودن آب شیرین استریل به آن تهیه گردید (Kim, 2004). آزمایشات مربوط به هر تیمار شوری در سه تکرار و دو بار طی این مطالعه انجام شد. به منظور بررسی روند و نرخ رشد ریزجلبک *N. oculata*، هر روز سه نمونه ۱ میلی لیتری از ریزجلبک، در شرایط کاملاً استریل و پس از همگن کردن محتویات ارلن‌های مورد آزمایش، با استفاده از پیپت کاملاً استریل برداشت نموده و با محلول لوگل تثبیت و با استفاده از لام شمارش هموسیتمتر و با کمک یک دستگاه میکروسکوپ اینورت TS100 و یک دستگاه شمارشگر دیجیتال (LABTRON مدل LC-10) اقدام به شمارش و ثبت تعداد سلولهای جلبکی نموده و در پایان با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Guillard و همکاران (۱۹۷۳) نرخ رشد تعیین گردید: $\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$ که N_1 و N_2 تعداد سلول های فیتوپلانکتونی در زمان های t_1 (روز اول) و t_2 (روز پایانی) می باشد. برای تعیین زیتوده، حجم معینی از ریزجلبک را در پایان دوره آزمایش برداشت نموده و از خلال کاغذ صافی خشک که وزن اولیه آن یادداشت شده عبور داده شد. کاغذ صافی را در انکوباتور فن دار و در درجه حرارت 10.5°C به مدت ۲ ساعت قرار داده شد تا وزن ثابت بدست آید. کاغذ صافی را در دیسیکاتور به مدت ۱ ساعت سرد نموده و دوباره با ترازوی دقیق ۰/۰۰۱ گرم وزن نموده شد. وزن خشک را از تفاضل وزن خشک کاغذ فیلتر حاوی جلبک و کاغذ فیلتر اولیه (کاغذ فیلتر را به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت 10.5°C قرار داده و وزن آن را اندازه می گیریم) بدست آورده شد. به منظور تعیین میزان کلروفیل *a* و کارتنوئید در پایان دوره آزمایش از هر تیمار به مقدار ۱۰ سی سی

اکسیدانی قوی است (Edge et al., 1997) و بدلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی که این رنگدانه دارد از آن در تهیه مکمل‌های غذایی و مواد دارویی استفاده می‌شود (Tim et al., 2007). کلروفیل‌ها رنگدانه‌ای سبز رنگ بوده و در بقا و حیات گیاهان از طریق شرکت در فرایند فتوسنتز نقش بسیار مهمی را ایفا می کنند (Sharma, 2001). ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* متعلق به رده Eustigmatophyceae بوده که شامل ۶ جنس است. این ریزجلبک ها دارای سلول های کوچک با مورفولوژی ساده می باشند که در آب شور زندگی می کنند این ریزجلبک ها غیرمتحرک، به رنگ سبز و بدون تاژک هستند. همه گونه ها تک سلولی و کوچک بوده و اندازه قطر آنها ۴-۶ میکرون می باشد (Suklenik, 1989). با توجه به اینکه ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* به خاطر نرخ رشد و تولید زیتوده بالا و همچنین دارا بودن میزان بالای چربی به ویژه اسیدهای چرب غیر اشباع به منظور تغذیه لارو ماهی و روتیفر در آبی پروری مورد توجه پرورش دهندگان قرار گرفته است و نیز این ریزجلبک قادر به ساخت طیف وسیع و با غلظت بالایی از رنگیزه های ارزشمند آستاگزانتین (astaxanthin)، کانثاگزانتین (canthaxanthin) و زاکسانتین (zeaxanthin) می باشد که می تواند به عنوان مکمل غذای انسانی مورد تغذیه قرار گیرد. طبق نتایج بدست آمده توسط دیگر محققین، در ارتباط با تاثیر شوری بر روی میزان زیتوده و کلروفیل *a*، مناسب ترین شوری بین ۲۵ تا ۳۵ گزارش شده است اما در ارتباط با تاثیر شوری بر میزان و رنگدانه کارتنوئید در این ریزجلبک اطلاعات زیادی وجود ندارد از این رو در این تحقیق، تعیین مناسب ترین شوری برای تولید بیشینه رشد و زیتوده ریزجلبک *Nannochloropsis oculata* و تعیین مناسب ترین شوری برای تولید بیشینه رنگیزه کارتنوئید و کلروفیل *a* مورد تحقیق و بررسی قرار گرفت. ریزجلبک *N. oculata* از فایکولب بخش آبی پروری پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان تهیه گردید. تمامی آزمایشات در آزمایشگاه بخش آبی پروری پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان بندرعباس در تابستان ۱۳۹۲

اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل a و کارتنوئید به ترتیب به کمک معادلات ارائه شده توسط Parsons و همکاران (1984) و Wellburn (1994) بدست آمد. اطلاعات و داده‌های بدست آمده در نرم‌افزار Excel وارد شده و نتایج توصیفی بصورت جدول و نمودار تهیه گردید. تحلیل آماری نتایج در برنامه SPSS و با بکارگیری آزمون‌های پارامتری ANOVA آنالیز واریانس یک‌طرفه و دوطرفه جهت مقایسه میانگین داده‌ها مورد بررسی بکار رفته و سطح معنی دار برای داده‌ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. جدول ۱ تراکم ریزجلبک را طی ۱۴ روز کشت در شرایط آزمایشگاهی و در شوری‌های مختلف نشان می‌دهد.

نمونه برداشت نموده و برای کاهش شوری به نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر آب مقطر نیز اضافه گردید. نمونه‌ها بوسیله دستگاه پمپ خلاء وبا استفاده از دستگاه کلروفیل از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده و کاغذهای صافی حاوی نمونه‌ها را درون لوله سانتریفیوژ قرار داده و به آن ۱۰ میلی‌لیتر استن ۹۰٪ اضافه شد. سر لوله‌ها را با پارافیلیم گرفته و در شرایط کاملاً تاریک در یخچال بمدت ۲۴ ساعت نگهداری کرده، سپس نمونه‌ها را با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب کلروفیل a را در ۴ طیف نوری با طول موج های ۶۴۵، ۷۵۰، ۶۶۳، ۶۳۰ و میزان جذب کارتنوئید را در ۲ طیف نوری با طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰،

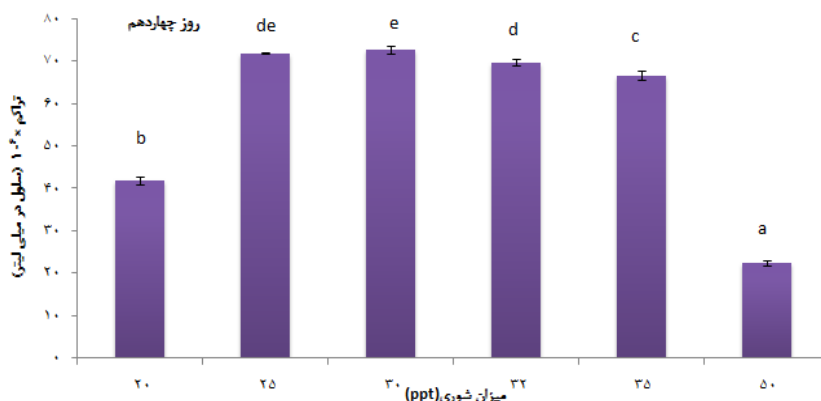
جدول ۱: میانگین تراکم سلولی ($\text{cell} \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) ریزجلبک *N. oculata* کشت داده شده در شوری‌های مختلف طی ۱۴ روز^a داده‌ها میانگین سه تکرار \pm S.D. می‌باشند.

روز	شوری (ppt)					
	۲۰	۲۵	۳۰	۳۲	۳۵	۵۰
نخست	$1/02 \pm 0/0$	$1/02 \pm 0/0$	$1/02 \pm 0/0$	$1/02 \pm 0/0$	$1/02 \pm 0/0$	$1/02 \pm 0/0$
دوم	$2/34 \pm 0/37$	$2/78 \pm 0/16$	$2/74 \pm 0/13$	$2/60 \pm 0/27$	$2/46 \pm 0/32$	$2/70 \pm 0/10$
سوم	$4/06 \pm 0/37^a$	$0/00 \pm 0/22^{bc}$	$0/60 \pm 0/05^{bc}$	$0/77 \pm 0/16^c$	$4/83 \pm 0/17^{ab}$	$4/24 \pm 0/36^a$
چهارم	$7/04 \pm 0/32^a$	$12/29 \pm 0/27^b$	$10/64 \pm 0/69^c$	$16/30 \pm 0/27^c$	$2/46 \pm 0/32^b$	$2/70 \pm 0/10^a$
پنجم	$10/74 \pm 0/02^b$	$20/60 \pm 0/49^c$	$27/08 \pm 1/71^d$	$28/87 \pm 0/84^d$	$21/28 \pm 0/79^c$	$12/61 \pm 1/09^a$
ششم	$21/08 \pm 0/49^b$	$30/70 \pm 0/24^c$	$36/82 \pm 1/03^d$	$30/90 \pm 0/78^d$	$30/37 \pm 0/03^c$	$17/40 \pm 2/10^a$
هفتم	$29/13 \pm 1/76^b$	$41/08 \pm 0/39^{cd}$	$43/60 \pm 0/90^d$	$41/72 \pm 1/03^d$	$37/73 \pm 1/93^c$	$21/26 \pm 2/39^a$
هشتم	$33/00 \pm 3/06^b$	$01/74 \pm 0/79^c$	$02/19 \pm 1/31^c$	$00/81 \pm 0/69^c$	$47/00 \pm 1/01^c$	$22/97 \pm 2/06^a$
نهم	$30/30 \pm 2/84^b$	$62/40 \pm 6/16^d$	$08/90 \pm 0/69^{cd}$	$06/83 \pm 0/21^{cd}$	$03/13 \pm 0/90^c$	$24/10 \pm 1/60^a$
دهم	$39/02 \pm 2/13^b$	$60/67 \pm 1/81^d$	$63/84 \pm 0/70^d$	$61/08 \pm 0/60^d$	$06/42 \pm 1/82^c$	$42/79 \pm 1/90^a$
یازدهم	$41/01 \pm 1/30^b$	$69/92 \pm 0/81^d$	$69/30 \pm 0/37^d$	$66/17 \pm 0/97^d$	$08/12 \pm 1/44^c$	$20/37 \pm 2/04^a$
دوازدهم	$41/27 \pm 1/37^b$	$70/80 \pm 0/14^d$	$70/89 \pm 1/11^d$	$67/88 \pm 1/46^d$	$63/28 \pm 0/62^c$	$20/22 \pm 2/79^a$
سیزدهم	$41/08 \pm 1/11^b$	$71/30 \pm 0/39^d$	$71/41 \pm 1/24^d$	$69/17 \pm 1/09^d$	$64/48 \pm 0/86^c$	$23/00 \pm 1/66^a$
چهاردهم	$41/81 \pm 0/97^b$	$71/80 \pm 0/20^{de}$	$72/63 \pm 1/00^e$	$69/62 \pm 0/72^d$	$66/00 \pm 1/08^c$	$22/39 \pm 0/06^a$

حروف زیرنگاره مختلف در هر ردیف نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین‌ها می‌باشد ($p < 0.05$)

میلی‌لیتر) نمی‌باشد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$) و کمترین تراکم و رشد سلولی به ترتیب مربوط به شوری ۵۰ ppt ($1.06 \times 22/39$) سلول در میلی‌لیتر) می‌باشد (نمودار ۱).

شمارش سلولهای فیتوپلانکتونی در روز چهاردهم کشت نشان داد که بیشینه تراکم مربوط به تیمار با شوری ۳۰ ppt ($1.06 \times 72/63$ سلول در میلی‌لیتر) است که دارای اختلاف معنی‌داری با شوری ۲۵ ppt ($1.06 \times 71/85$ سلول در

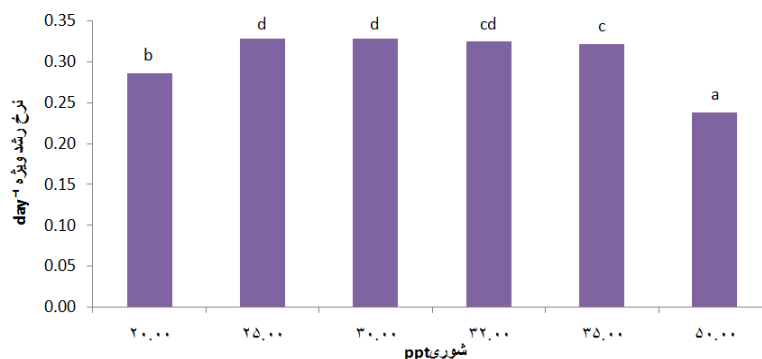


شکل ۱: تراکم ریز جلبک *N. oculata* در شوری‌های مختلف در روز چهاردهم

حروف زبرنگاره مختلف در هرستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد ($p < 0.05$).

دار می‌باشد ($p < 0.05$) و نیز پایین ترین نرخ رشد ویژه مربوط به تیمار با شوری ۵۰ ppt (0.24 d^{-1}) (نمودار ۲).

طبق شکل ۲ بالاترین نرخ رشد ویژه ریز جلبک مربوط به تیمار با شوری ۲۵ و ۳۰ ppt بوده (0.33 d^{-1}) که دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار با شوری ۳۲ ppt (0.32 d^{-1}) نمی‌باشد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی-



نمودار ۲: نرخ رشد ویژه (SGR) ریز جلبک *N. oculata* در شوری‌های مختلف

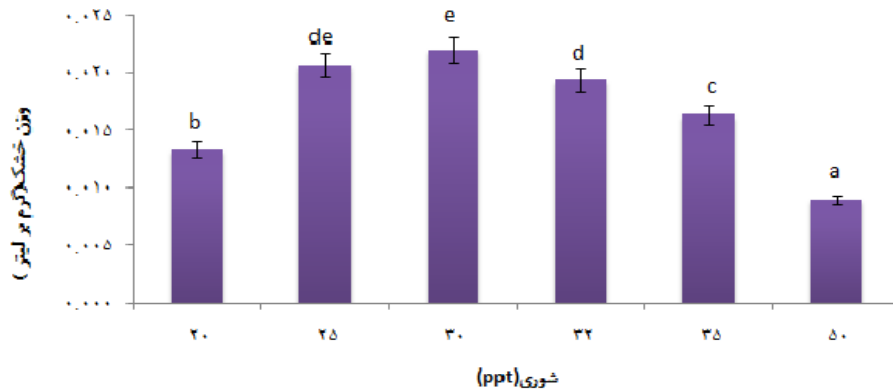
(حروف زبرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین ها می باشد ($p < 0.05$)).

آن مربوط به تیمار با شوری ۲۵ ppt بوده است (0.21 گرم بر لیتر) که اختلاف معنی‌داری بین تیمار با شوری

با توجه به شکل ۳ بالاترین وزن خشک ابتدا متعلق به تیمار با شوری ۳۰ ppt است (0.22 گرم بر لیتر) و پس از

وزن خشک مربوط به تیمار با شوری ۵۰ ppt (۰/۰۰۹ گرم بر لیتر) می باشد (نمودار ۳).

۲۵ ppt و ۳۰ ppt وجود ندارد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$) و کمترین

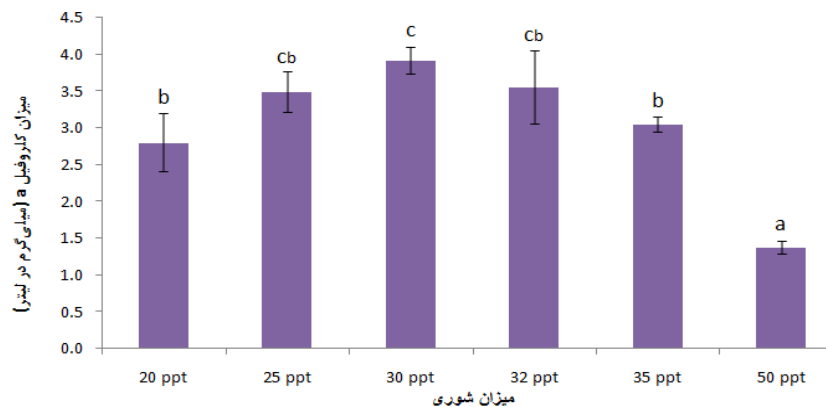


نمودار ۳: میزان وزن خشک ریز جلبک *N. oculata* در شوری‌های مختلف

(حروف زیرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین‌ها می باشد ($p < 0.05$)).

لیتر) نشان نداد اما نسبت به سایر شوری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0.05$) و کمترین میزان کلروفیل a مربوط به تیمار با شوری ۵۰ ppt (۱/۳۷ میلی گرم در لیتر) می باشد (نمودار ۴).

طبق شکل ۴ بیشینه میزان کلروفیل a در تیمار با شوری ۳۰ ppt بدست آمد (۳/۹۲ میلی گرم در لیتر) که اختلاف معنی‌داری با تیمارها با شوری‌های ۲۵ ppt (۳/۴۹ میلی گرم در لیتر) و ۳۲ ppt (۳/۵۵ میلی گرم در لیتر) وجود ندارد.

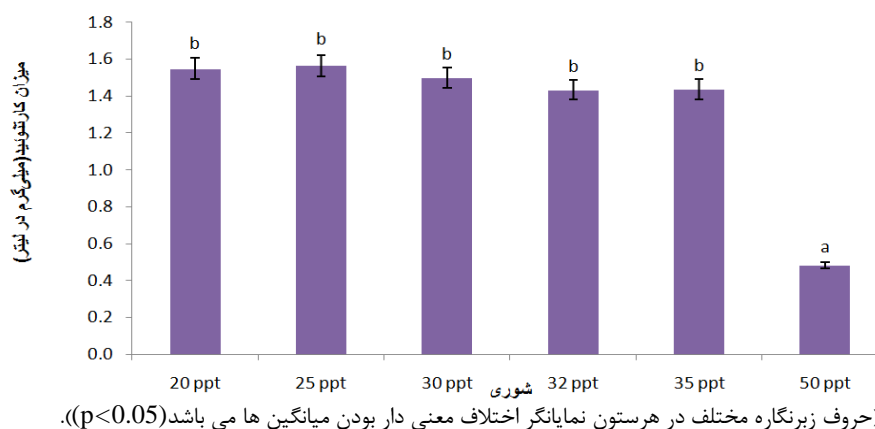


نمودار ۴: میزان کلروفیل a ریز جلبک *N. oculata* در شوری‌های مختلف

(حروف زیرنگاره مختلف در هر ستون نمایانگر اختلاف معنی دار بودن میانگین‌ها می باشد ($p < 0.05$)).

(نمودار ۵). نسبت کلروفیل a به کارتنوئید در تمامی تیمارها و شوری‌های مختلف یکسان بدست آمده است (نمودار ۵).

میزان کارتنوئید تولید شده در ریز جلبک *N. oculata* در شوری‌های ۲۰ تا ۳۵ ppt یکسان بوده (۱/۴۵ میلی گرم در لیتر) و کمترین کارتنوئید تولید شده مربوط به تیمار با شوری ۵۰ ppt (۰/۴۱ میلی گرم در لیتر) می‌باشد



رشد کاهش می‌یابد. بحث دیگری که در این مطالعه مورد سنجش و بررسی قرار گرفت میزان وزن خشک و SGR (نرخ رشد ویژه) می‌باشد. با توجه به اینکه در این مطالعه کشت ریز جلبک طی ۱۴ روز بوده بالاترین وزن خشک مربوط به شوری ۳۰ppt بوده که دارای اختلاف معنی-داری با شوری ۲۵ppt نبوده است اما نسبت به سایر شوری‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$) و با افزایش شوری از ۳۲ به ۵۰ppt میزان وزن خشک و SGR نیز کاهش یافت. وزن خشک و SGR پایین به علت افزایش شوری در این مطالعه مشابه با نتایجی بود که در گونه‌های *Dunaliella salina* و *Spirulina platensis* گزارش شد. هنگامیکه این دو گونه تحت استرس با افزایش شوری قرار گرفتند، میزان وزن خشک و SGR در این دو گونه کاهش یافت (Fu & Bell, 2003; Rosales, et al., 2005). Gu و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای که داشتند بیان نمودند هنگامیکه ریزجلبک‌ها تحت استرس شوری واقع شدند، با افزایش شوری میزان وزن خشک و SGR نیز کاهش یافت و در طول افزایش شوری رشد به کندی صورت گرفت که با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت داشت. Gu و همکاران (۲۰۱۲) بیان نمودند با افزایش شوری از ۳۵ تا ۵۵ ppt میزان وزن خشک کاهش یافت و نیز بیان داشتند در طی ۱۹ روز کشت، این ریزجلبک دارای بالاترین وزن خشک در شوری ۳۵ ppt و دارای بالاترین میزان کلروفیل a و کارتنوئید در شوری ۲۵ppt بوده است. در این تحقیق مشاهده شد که بالاترین میزان کلروفیل a در

نتایج به دست آمده در این تحقیق حاکی از آن است که میانگین شوری‌های مناسب برای رشد ریزجلبک *N. oculata* ۲۵، ۳۰ و ۳۲ ppt می‌باشند که در شوری ۳۰ppt بالاترین میزان رشد و تراکم ریزجلبکی (زیتوده) بدست آمده و همچنین با افزایش شوری از ۳۲ppt به ۵۰ppt میزان رشد سلولی و تراکم نیز کاهش یافته است. در مطالعه‌ای مشابه که برای تعیین پارامترهای بهینه رشد ریزجلبک *N. oculata* توسط Spolaore و همکاران (۲۰۱۰) طی ۱۹ روز کشت انجام گرفت، نشان دادند که بیشینه زیتوده این ریزجلبک در شوری ۴۵ppt با درجه حرارت ۲۰ °C بدست آمده است. در این تحقیق با افزایش شوری میزان رشد سلولی کاهش یافت که با نتایجی که Gu و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر تغییرات شوری بر روی رشد و ترکیبات شیمیایی جلبک *N. oculata* بدست آوردند مطابقت دارد، نتایج نشان داد، از آنجاییکه نوسانات شوری یک فاکتور مهم در کشت ریزجلبک‌ها به شمار می‌آید، هنگامیکه میزان شوری پایین باشد، رشد ریزجلبک افزایش یافته و با افزایش میزان شوری میزان رشد و تراکم سلولی و یا به عبارتی زیتوده کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ای مشابه شریعتی و مددکارحقجو (۱۳۷۹) در گونه *D. salina* نیز به این نتیجه رسیدند که افزایش شوری موجب کاهش نرخ رشد سلول‌ها گردیده است. Kirst (۱۹۸۹) علت را اینگونه بیان نمود که با افزایش شوری سلول‌ها ورم نموده و باعث اتساع غشا پروتوپلاسمی سلول گردیده و در نتیجه سلول‌ها انرژی بیشتری را برای ادامه حیات صرف کرده و در نتیجه

D. salina ۲ مولار بوده و در این شوری بیشینه زیتوده را داشته‌اند به طوری که در محیط کشت با شوری ۱/۵ مولار میزان زیتوده کاهش یافته است. در این مطالعه نیز شوری بالا باعث کاهش میزان کلروفیل گردید. شریعتی و مددکار حقجو در سال ۱۳۷۹ در بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن و کلروفیل محتوای جلبک تک سلولی *D. salina* جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان شوری موجب کاهش نرخ رشد سلول‌ها و افزایش مقدار بتاکاروتن سلول‌ها در محیط کشت می‌گردد و تأثیر شوری در افزایش بتاکاروتن سلول‌ها، نسبت به تأثیر کمبود مواد غذایی محیط مؤثرتر می‌باشد. که تقریباً مشابه با نتایج بدست آمده در این مطالعه بود، که افزایش میزان شوری باعث کاهش نرخ رشد سلول‌ها گردید اما افزایش شوری تأثیری بر روند تولید کارتنوئید نداشته و فقط در شوری ۵۰ ppt تولید کارتنوئید کاهش یافت همچنین Fu و Bell (۲۰۰۳) بیان نمودند با افزایش شوری کلروفیل *a* در *B. braunii* و *Trichodesmium.sp* و کارتنوئید در *B. braunii* افزایش یافت. Guedes و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ریزجلبک‌ها به عنوان منبع کارتنوئید بیان کردند که شرایط اپتیمم برای تولید بالاترین میزان بتاکاروتن در جلبک دنالیلا سالینا دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و $PH=5$ می‌باشد و شریعتی و مددکار حقجو در مطالعه -ای سال ۱۳۷۹ داشتند به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان شوری موجب کاهش نرخ رشد سلول‌ها و افزایش مقدار بتاکاروتن سلول‌ها در محیط کشت می‌گردد و تأثیر شوری در افزایش بتاکاروتن سلول‌ها، نسبت به تأثیر کمبود مواد غذایی محیط مؤثرتر می‌باشد. نتیجه قابل توجه در این مطالعه میزان کارتنوئید تولید شده می‌باشد که از شوری ۲۰ تا ۳۵ppt به یک میزان است. با توجه به گزارشات و مطالعات گذشته که مناسب‌ترین شوری برای رشد ریزجلبک *N. oculata* بین ۲۰ تا ۳۵ppt می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که ریزجلبک مورد نظر در اپتیمم شوری بالاترین میزان کارتنوئید را دارا بوده و فقط در شوری ۵۰ppt داری کمترین میزان کارتنوئید است که احتمال می‌رود به دلیل میزان کمتر رشد و تراکم سلولی

شوری ۳۰ppt بوده که ریزجلبک در این شوری نیز بالاترین میزان تراکم را دارا بوده است و پایین‌ترین میزان کلروفیل *a* در شوری ۵۰ppt بوده که پایین‌ترین میزان تراکم را دارا بوده است و احتمال می‌رود به دلیل میزان تراکم ریزجلبک در شوری مورد نظر باشد. در مطالعه‌ای که Warr و همکاران (۱۹۸۵) در تنظیم اسمتیک *Spirulina platensis* داشته، مشاهده کردند هنگامی که میزان رنگدانه‌ها مخصوصاً کلروفیل *a* تحت شوری بالا کاهش می‌یابد بازده فتوسنتیک نیز کاهش می‌یابد در نتیجه به طور قابل توجهی تولیدات زیتوده در برخی ریز-جلبک‌ها کاهش یافت که با نتایج بدست آمده در این مطالعه هم‌خوانی داشته و مشاهده شد با افزایش شوری از ۳۲ppt به ۵۰ppt میزان زیتوده و کلروفیل *a* کاهش یافت. در این مطالعه با افزایش شوری از ۳۵ به ۵۰ppt رنگ ریزجلبک روشن‌تر شد و نیز میزان کلروفیل *a*، کارتنوئید و میزان رشد کاهش یافت و این نیز مطابقت داشته با مطالعه‌ای که Gu و همکاران (۲۰۱۲) داشته و بیان نمودند که با افزایش شوری از ۴۵ تا ۵۵ppt رنگ سبز جلبک روشن‌تر شد و نیز کاهش قابل توجهی در میزان کلروفیل *a*، کارتنوئید و میزان رشد مشاهده شد. نتیجه دیگری که Gu و همکاران (۲۰۱۲) در این مطالعه بیان نمودند این بود که میزان کلروفیل *a* و کارتنوئید در طی تغییرات شوری از ۲۵ تا ۳۵ppt افزایش یافت. در این تحقیق نیز در طی تغییرات شوری از ۲۰ تا ۳۰ppt میزان رشد ریزجلبک و میزان کلروفیل *a* افزایش یافت و نیز مشاهده شد ریزجلبک دارای بالاترین میزان کلروفیل *a* در تیمار با شوری ۳۰ppt است و این نیز هم-خوانی داشته با گزارشاتی که Fazeli و همکاران (۲۰۰۶) ارائه دادند که شوری پایین می‌توانست میزان کلروفیل *a* و کارتنوئید را در *Dunaliella tertiolecta* افزایش دهد. Pisal و Lele (۲۰۰۵) با مطالعه بر روی میزان کارتنوئید تولید شده از میکروجلبک *D. salina* به این نتیجه رسیدند که با استفاده از پارامترهای استرسی متفاوت، مثل شوری بالا، دمای بالا و کمبود نیتروژن باعث افزایش میزان کارتنوئید و کاهش میزان کلروفیل می‌گردد و نیز مشاهده کردند که میزان اپتیمم غلظت شوری برای رشد

- Photochemistry and Photobiology, pp. 189–200.
- Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H. and Fazeli, A., 2006.** Carotenoids accumulation by *Dunaliellateriolecta* (lake urmia isolate) and *Dunaliella salina* (ccap 19/18 &wt) under stress conditions. *Daru*, 14(3):117–129.
- Fu, F. and Bell, P.R.F., 2003.** Effect of salinity on growth, pigmentation, N₂ fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Marine Ecology Progress Series*, 257: 69–76.
- Gent University, 2001.** Production and use of livefood for aquaculture. Courseware developed at the Laboratory of Aquaculture & Artemia Reference Center, Gent University.
- Gourveia, L.A.D., Rema, P.B., Pereira, O.B. and Empis, J.C., 2003.** Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture Nutrition*, 9(2): 123–129.
- Gu, N., Lin, Q., Li, G., Qin, G., Lin, J. and Huang, L., 2012.** Effect of Salinity Chang on Biomass and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of the WORD AQUACULTURE SOCIETY*, 43, NO.1.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X., 2011.** Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar. Drugs*, 9: 625–644.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H., 1962.** Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and در شوری موردنظر باشد. به عنوان نتیجه گیری کلی می توان عنوان نمود شوری بهینه برای تولید بیشینه ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* شوری ۳۰ ppt می باشد. با توجه به اینکه رشد سلولی ریز جلبک در شوری ۵۰ ppt متوقف نشد می توان نتیجه گرفت که ریز جلبک *N. oculata* نسبت به شوری بالا مقاوم بوده و طبق گزارشات مطالعات پیشین و مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که ریز جلبک در دامنه وسیعی از شوری توانایی رشد را دارد و نیز تولید کارتنوئید در ریز جلبک مربوطه در شرایط اپتیمم رشد به یک میزان بود و از آنجاییکه ریز جلبک *N. oculata* چه از نظر نقطه نظر تولید بالای زیتوده جلبکی و چه از نظر نقطه نظر کارتنوئید حائز اهمیت است از این رو در این مطالعه سعی گردید با انجام آزمایشات مربوطه اپتیمم شرایط لازم برای تولید بیشینه زیتوده و کارتنوئید در ریز جلبک *N. oculata* تعیین نموده تا گام مهمی علاوه بر تامین غذای زنده مراکز تکثیر آبزیان، و با توجه به مناسب بودن درصد کارتنوئید تولید شده، در تامین بخشی از نیازهای صنایع غذایی و دارویی برداشته شود.
- ### منابع
- آذری تاکامی، ق. و امینی چرمهینی، م.، ۱۳۹۰ (ترجمه). دستور العمل تکثیر و پرورش پلانکتون ها. چاپ اول. موسسه انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۷ صفحه.
- شریعتی، م. و مددکار حقجو، م.، ۱۳۷۹. بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن و کلروفیل محتوای جلبک سبز دنالیا سالینا جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان، مجله پژوهشی علوم دانشگاه اصفهان، دوره ۱۴، شماره ۲، صفحات ۵۵–۶۶.
- Edge, R., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G., 1997.** The carotenoid as antioxidants. A review. *Journal of Detonulaconfervacea (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229–239.

- Guillard, R.R.L., 1973.** Division rates. In: Stein, J.R. (Ed.), Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289–311.
- Heasman, M., Diemar, J., O'connor, W., Sushames, T. and Foulkes, L., 2000.** Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs, Aquaculture Research, 31: 637–659.
- Kim, D.I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.H., Oshima, Y., Imada, N. and Honjo, T., 2004.** Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). J. plankton. Res, 26: 61–66.
- Kirst, G.O., 1989.** Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 40:21–53.
- Kop, A. and Durmaz, Y., 2008.** The effect of synthetic and natural pigments on the colours of the cichlids (*Cichlasoma severum* sp., Heckel 1840). Aquaculture, 16:117–122.
- Parsons, T.R., Maita, Y. and LALM, C.M., 1984.** Determination of chlorophylls and total carotenoids: spectrophotometric method. In: A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis (Ed. by T. R. Parsons, Y. Maita & C. M. Lalli), pp. 101–104. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Pisal, D.S. and Lele, S.S., 2005.** Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. Indian J. Biotech, 4:476–483.
- Rebollosa Fuentes, M.M., Acién Fernández, G.G., Sánchez Pérez, J.A. and Guill Guerrero, J.L., 2000.** Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. Food Chem, 70, 345–353.
- Rosales, N., Ortega, J., Mora, R. and Morales, E., 2005.** Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the *Cyanobacterium synechococcus*. Ciencias Marinas, 31:349–355.
- Sharma, O.P., 2001.** Text book of algae. Tata McGraw Hill Publishing, India.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isamber, A., 2010.** Optimization of *Nannochloropsis groeth* using the response surface method. Journal of chemical technology and biotechnology. 81:1049.
- Sukenik, A., Garmeli, Y. and Berner, T., 1989.** Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol. 25: 686–692.
- Tim, J., Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L. and Nikoskelainen, A., 2007.** Seasonal variation and immune response: A fish perspective. Department of Zoology, University of Aberdeen, Scotland, UK. pp. 695–70

Warr, S.R.C., Reed, R.H., Chudek, J.A., Foster, R. and Steward, W.D.P., 1985. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. *Planta* 163: 424–429.

Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as

well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307–313.

Study on the effect of salinity changes on growth, biomass, and chlorophyll a and carotenoid pigments of microalgae *Nannochloropsis oculata*

Rahimisuruee M.^{1*}; Rohani Ghadikolaie K.²; Mohammadizade F.¹

* m.rahimisuruee@gmail.com

1- Islamic Azad university, Bandarabbas, Iran.

2-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension, Bandarabbas, Iran

Abstract

In this study the effect of different salinities on growth, biomass and pigments of Chlorophyll a and Carotenoid were tested to determine an appropriate salinity to produce maximum growth, biomass and carotenoids of microalgae (*N.oculata*). Therefore, the 2-liter flask contains microalga under different levels of salinities (20, 25, 32, 35, 50 ppt), and under laboratory conditions(temperature 25-22 ° C, PH. 8, and light period of 12 h light and 12 h darkness) were cultured for 14 days. The results of present study indicate that The maximum growth of microalgae ($72.63 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$) and the maximum specific growth rate of microalgae (0.33 d^{-1}) included in treatments with salinity of 25 and 30 ppt, that had a significant difference with the other treatments ($p < 0.05$). The maximum dry weight (0.022 g/lit) and amount of chlorophyll a (3.92 mg lit) was recorded in treatments with salinity of 30 ppt and shows significant difference with the other treatment ($p < 0.05$). The Minimum amount of carotenoids (0.41 mg lit) was related to treatment with salinity of 50 ppt. shows a significant difference with other treatments ($p < 0.05$). According to the results we can say that microalgae resistant to high salinity and a wide range of salinity has the ability to grow and produce carotenoids.

Keywords: Salinity, Chlorophyll a, Carotenoid, Growth, *Nannochloropsis oculata*

*Corresponding author